



研究报告

不动杆菌 JL-1 菌株的解磷机理

李文 戴玲 王陶* 严斌 倪琳 李同祥

徐州工程学院江苏省食品资源开发与质量安全重点建设实验室 江苏 徐州 221018

摘要:【背景】不动杆菌(*Acinetobacter indicus*) JL-1 菌株可将土壤中难溶性磷转化为植物可吸收利用的可溶性磷,但其解磷机理尚不明确。【目的】探讨不动杆菌 JL-1 菌株的解磷机理。【方法】采用钼蓝比色法测定菌株在不同难溶性磷源中的解磷效果,确定最佳磷源;通过粒径测定法、超声破碎法、高效液相色谱法等多种方法,检测不动杆菌 JL-1 菌株在解磷过程中对磷酸钙的溶解作用、对磷的固化作用及产有机酸和磷酸酶酶活情况。【结果】不动杆菌 JL-1 菌株在磷酸钙液体培养基中解磷效果最佳,解磷量在 48 h 达到最高值 118.04 $\mu\text{g/mL}$ 。在解磷过程中, JL-1 菌株对磷酸钙具有溶解作用,菌株自身固化了部分磷;可溶性磷的释放是发酵过程中产生的葡萄糖酸、丙酸、乙酸、乳酸等多种有机酸与磷酸酶共同作用的结果,有机酸中丙酸含量最高可达 118.11 mg/mL ;酸性磷酸酶酶活最高为 22 901.32 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,碱性磷酸酶酶活最高为 23 826.02 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。【结论】不动杆菌 JL-1 菌株在解磷过程中对磷酸钙颗粒显示出一定的溶解作用,通过分泌有机酸和磷酸酶使可溶性磷释放,同时菌体固化了一部分磷,本研究为不动杆菌应用于农业生产提供了一定的实验数据参考。

关键词: 不动杆菌 JL-1, 解磷, 解磷机理, 有机酸, 磷酸酶

Research on phosphate solubilization by *Acinetobacter indicus* JL-1

LI Wen DAI Ling WANG Tao* YAN Bin NI Lin LI Tong-Xiang

Jiangsu Key Construction Laboratory of Food Resource Development and Quality Safe, Xuzhou University of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221018, China

Abstract: [Background] *Acinetobacter indicus* JL-1 can convert the insoluble phosphorus into soluble phosphate, which can be absorbed by plants, but the mechanism has not been known clearly. [Objective] *Acinetobacter indicus* JL-1 was used to study the mechanism of phosphate solubilization primarily. [Methods] To determine the optimal phosphorus source, the phosphorus solubility of strain JL-1 in different insoluble phosphorus sources was detected by using Mo-blue colorimetric method, particle-size distribution, ultrasonic crushing, HPLC detection were used to study the dissolving effect on calcium phosphate, the storage of phosphorus, and the produced organic acids and phosphatase activity during

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31270577); Key University Science Research Project of Jiangsu Province (16KJA210001); Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (SWYY-222); Xuzhou Science and Technology Planning Project (KC18151); Key Cultivation Project of Xuzhou Institute of Technology (XKY2017123, XKY2018138)

*Corresponding author: E-mail: wangtaohf@126.com

Received: 21-08-2019; Accepted: 25-10-2019; Published online: 22-11-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31270577); 江苏省高校自然科学研究重大项目(16KJA210001); 江苏省“六大人才高峰”培养资助项目(SWYY-222); 徐州市科技计划项目(KC18151); 徐州工程学院培育项目(XKY2017123, XKY2018138)

*通信作者: E-mail: wangtaohf@126.com

收稿日期: 2019-08-21; 接受日期: 2019-10-25; 网络首发日期: 2019-11-22

fermentation. **[Results]** *Acinetobacter indicus* JL-1 showed the best phosphate-solubilizing ability in the liquid medium with calcium phosphate, the solubilizing phosphate concentration peaked at 118.04 $\mu\text{g/mL}$ at 48 h incubation. Strain JL-1 had the dissolving effect on calcium phosphate and could absorb a part of the released phosphorus. The dissolved phosphorus was released by the combined action of organic acids and phosphatase. Organic acids contained gluconic acid, propionic acid, acetic acid, lactic acid, etc. and propionic acid content was up to 118.11 mg/mL ; the highest acid phosphatase activity was 22 901.32 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, and the highest alkaline phosphatase activity was 23 826.02 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$. **[Conclusion]** Strain JL-1 had the erosion effect on calcium phosphate, the soluble phosphate was released by the organic acids and phosphatase produced during fermentation, some of the phosphate was absorbed by strain cells. The results improve the feasibility that *Acinetobacter indicus* can be used in agricultural production and provides data reference.

Keywords: *Acinetobacter indicus* JL-1, Phosphate solubilization, Mechanism of phosphate solubilization, Organic acid, Phosphatase

磷是植物生长发育所必需的大量元素, 参与酶的各种功能和活性调节, 与种子的形成、植物的生长、细胞代谢过程中积累和释放能量等生理过程密切相关^[1-3]。足够多的磷酸盐对于植物生长和发育有着极大的促进作用, 能增强植物根部的御寒能力, 但如果磷的供给不足, 合成核酸和核蛋白会受到影响, 细胞的形成和扩散会被抑制, 根系的生长也会受到影响, 所以在农业生产中磷元素有着极其重要的作用^[4]。然而土壤中仅有0.1%的有效磷能被植物利用, 绝大部分以无效磷的方式存在^[5]。同时, 我国南方和北方的土壤都有不同程度磷酸盐缺乏的现象。通常情况下, 一般使用磷肥来解决各地土壤中磷元素的匮乏。但大量施用磷肥并不一定起到显著效果, 这是因为磷肥的利用率极低, 磷肥中的磷可与土壤中的 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 等金属离子发生反应, 转为无效形式; 此外, 磷肥中的部分磷因水土流失等问题慢慢进入水中, 当水中的磷含量过高时会导致水体富营养化, 对生态环境具有严重的破坏作用; 另外, 磷肥中除磷元素外, 还含有大量的其他金属元素, 磷肥的大量施用可能非但不能满足植物对磷的需求, 反而有可能加重土壤的重金属污染^[4]。因此, 开发微生物肥料是解决这一问题的有效途径之一, 从而增加有效磷的持续释放与存在。

解磷菌是一类可以把土壤中难以利用的磷酸

盐分解为植物能吸收的有效磷的微生物, 目前报道过的解磷菌有细菌、真菌、藻类、放线菌与不动杆菌等^[6-9]。解磷菌的解磷过程十分复杂, 解磷机理也多种多样。目前大量研究结果表明其主要的解磷机制有以下几个方面: (1) 解磷机制中最主要的是微生物产生有机酸解磷, 如葡萄糖酸、丙酮酸、柠檬酸、乙酸、苹果酸等^[10-11], 有机酸解磷是通过与金属离子的螯合作用而促进磷酸根被释放, 研究表明当有机酸形成后土壤中磷酸根离子的活性增加^[12-13]。(2) Illmer 等^[14]认为解磷过程会释放出 H^+ , 从而达到对不溶性磷的溶解。(3) 酶解磷也是相当重要的一个解磷机制, 细胞分泌出的酸性磷酸酶与碱性磷酸酶可加速有机化合物的分解, 从而促进降解磷素。宋勇春等^[15]的实验揭示了酶解磷的作用效果。(4) 部分解磷菌释放出的硫化氢能与磷酸铁产生作用, 生成可溶性磷盐而达到解磷^[16]。(5) 解磷菌能够释放出 CO_2 , 从而降低其生长环境的 pH 值, pH 值的降低也会使得不溶性磷被溶出。朱培森等^[17]发现发酵液的 pH 降低与解磷菌的解磷能力相关性很高。(6) 植物残体分解产生的胡敏酸可促进磷酸钙等形成可溶性的复合物, 进而从无效态的游离磷变成了有效态的固定磷^[16]。

不动杆菌作为一种解磷菌, 可将土壤中难溶性磷转化为植物可以吸收利用的可溶性磷, 但其解磷机制尚不明确。本文以实验室前期筛选得到的一株

解磷效果较好的不动杆菌(*Acinetobacter indicus*) JL-1 菌株^[6]为研究对象,对不动杆菌的解磷机理进行研究,探讨其对难溶性磷源的溶解效果,测定解磷过程中的有机酸种类、浓度及磷酸酶活,确定酸或酶在难溶性磷转化过程中的作用,对解磷微生物不动杆菌 JL-1 菌株的正确施用并发挥功效具有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

不动杆菌(*Acinetobacter indicus*) JL-1 来自徐州工程学院微生物遗传育种实验室。

不同磷源液体培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 0.5, NaCl 0.2, 葡萄糖 10.0, KCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.1, MnSO₄·4H₂O 0.03, 酵母粉 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.03, 各培养基加入不同磷源: Ca₃(PO₄)₂ 5.0, 过磷酸钙 5.0, AlPO₄ 5.0, FePO₄ 5.0, K₂HPO₄, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 牛肉浸膏 5.0, pH 7.0 左右, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

LB 固体培养基: LB 液体培养基中加入琼脂粉, 使其浓度为 18 g/L。

1.2 主要试剂和仪器

对硝基酚磷酸二钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 对硝基苯酚, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 三羟甲基氨基甲烷, 国药集团化学试剂有限公司。

旋式恒温调速摇瓶柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司; 智能型超声波细胞粉碎机, 上海之信仪器有限公司; 激光粒度分布仪, 丹东百特仪器有限公司; 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦(中国)科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 不动杆菌对不同不溶性磷源降解效果的比较

取 LB 固体斜面保藏的不动杆菌 JL-1 一环至 LB 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 恒温振荡培养

24 h, 即为种子液。制备磷酸钙、过磷酸钙、磷酸铁、磷酸铝液体培养基, 装液量为 150/250 mL, 将种子液接入上述培养基中, 接种量为 1%, 30 °C、120 r/min 恒温振荡培养 72 h, 每 12 h 取一次样, 动态监测降解磷源过程中的解磷量及 pH 值, 通过钼蓝比色法测定解磷量^[18]。

1.3.2 菌体自身对磷的固化作用

制备磷酸钙液体培养基培养不动杆菌, 接种量 1%, 装液量为 150/250 mL, 30 °C、120 r/min 培养, 间隔 12 h 取样, 取相同的发酵液 2 份, 一份置于超声波细胞粉碎仪中, 超声功率 600 W, 超声时间 5 s, 间隔时间 10 s, 超声次数 100 次; 另一份不做任何处理。然后将 2 份发酵液 8 000 r/min 离心 15 min 后分别测定磷含量, 菌体所吸收的磷含量(μg)=2 份溶液中磷含量的差值(μg/mL)×解磷体系的总体积(150 mL)。

1.3.3 发酵前后粒径的变化

制备磷酸钙液体培养基, 接种不动杆菌 JL-1 菌株, 在 30 °C 恒温振荡器中以 120 r/min 的转速培养 48 h 后取出, 于 4 000 r/min 离心 20 min, 留沉淀, 在沉淀中加入 10 mL 生理盐水制备菌悬液, 以不接菌的培养基作为对照。在激光粒度分布仪中测量其粒径分布, 参数设置: 物质折射率 1.52, 介质折射率 1.33, 超声分散时间 2 min, 循环泵速 1 600 r/min^[19-20]。

1.3.4 发酵液中有机酸的测定

不动杆菌 JL-1 菌株在磷酸钙液体培养基和磷酸氢二钾液体培养基发酵过程中产生的有机酸, 采用高效液相色谱法进行定性和定量分析^[21]。色谱柱为 Diamonsil Plus C18 (250×4.6 mm, 5 μm); 紫外检测波长 210 nm; 柱温 25 °C; 水相 pH 2.5 的 0.02 mol/L Na₂HPO₄, 有机相为纯甲醇, 比例为 96% 水相+4% 有机相; 流速 0.5 mL/min; 进样量 20 μL。

1.3.5 磷酸酶活的测定

制备磷酸钙液体培养基和磷酸氢二钾液体培养基培养 JL-1 菌株, 装液量为 150/250 mL, 接种量为 1%, 30 °C、120 r/min 振荡培养 3 d, 每 12 h

取一次样,动态监测降解磷源过程中的酸性磷酸酶以及碱性磷酸酶活性。

(1) 标准曲线的制作

取 1 mL 标准对硝基酚溶液(1 g/L)于 100 mL 容量瓶中并用无菌水定容至 100 mL,然后各吸取 0、1、2、3、4、5 mL 于 10 mL 试管中,加无菌水补足至 5 mL,最后加入 4 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液与 1 mL 0.5 mol/L CaCl_2 溶液,振荡混匀,过双层滤纸得澄清滤液,在 420 nm 处比色测定。以吸光度为纵坐标、以对硝基酚浓度为横坐标绘制标准曲线,见图 1。线性回归方程为 $y=0.1234x-0.015$,回归系数 $R^2=0.9972$,吸光度与对硝基酚浓度在 0–5 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内拥有很好的线性关系。

酶活单位定义为:以每小时 1 L 发酵液中作用于底物并释放出产物的摩尔数为 1 个酶活单位,记为 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。

(2) 酶活测定程序

取 1 mL 发酵液于干净的试管中,加入 4 mL MUB 缓冲液(酸性磷酸酶用 pH 6.5 的缓冲液,碱性磷酸酶用 pH 11.0 的缓冲液),再加入 0.025 mol/L 1 mL 用相同缓冲液配制的对硝基酚磷酸钠(PNPP)溶液,塞上塞子振荡使试管内的液体混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中培养 1 h,然后打开塞子再加入 0.5 mol/L CaCl_2 溶液 1 mL 和 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液 4 mL,

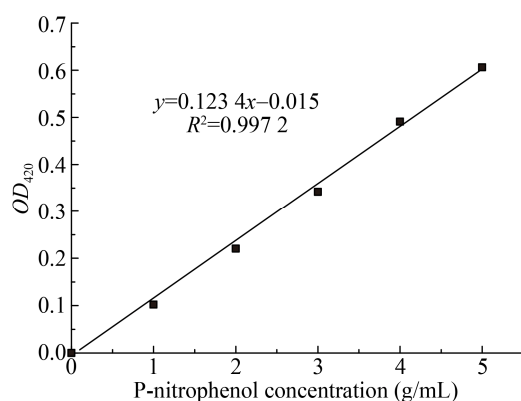


图 1 对硝基酚标准曲线

Figure 1 Standard curve of P-nitrophenol

振荡混匀于双层滤纸上过滤得澄清液,用紫外可见分光光度仪在波长 420 nm 下比色。同时做空白对照,先加入氯化钙溶液和氢氧化钠溶液,再加对硝基酚磷酸钠溶液,振荡后快速过滤。

(3) 酶活计算

$$\text{酶活计算公式: } X_i = \frac{C \times 11}{371.14 \times t \times V} \times 1000$$

式中, X_i : 磷酸酶的酶活, $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$; C : 回归方程计算所得的发酵液 PNPP 浓度, $\mu\text{g/mL}$; 11: 反应液体体系的总体积, mL; 371.14: PNPP 的分子质量; t : 酶反应时间, h; V : 粗酶液体积, mL。

1.3.6 数据处理

采用 Excel 2010、SPSS 19.0 对数据进行统计分析,采用 Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 不动杆菌 JL-1 菌株对不同难溶性磷源的解磷效果

磷酸钙、过磷酸钙、磷酸铁与磷酸铝均为难溶性磷源, JL-1 菌株对不同磷源的溶解效果有差异,其对上述 4 种难溶性磷源的溶解及发酵体系 pH 的变化如图 2 所示。

由图 2 可看出,在磷酸钙液体培养基中 JL-1 菌株在 48 h 时溶磷量达到最大值 118.04 $\mu\text{g/mL}$,结合 JL-1 菌株在磷酸钙培养基中的生长曲线^[22]以及 pH 变化曲线分析,在 0–24 h 菌体迅速繁殖时代谢产生了大量有机酸使 pH 降低,同时也溶解了磷酸钙,发酵液中的可溶性磷含量得以迅速升高;24–48 h 菌体生长处于稳定期,溶磷量增长速度变缓,直到达到峰值;48 h 后,菌体为了生长可能会利用发酵液中存在的部分磷素,所以溶磷量有所下降。可以看出发酵液中不动杆菌的溶磷能力与 pH 的变化呈负相关。在过磷酸钙液体培养基中 JL-1 菌株在 60 h 溶磷效果最佳为 24.32 $\mu\text{g/mL}$, pH 值自 7.12 下降到 3.16 后就稳定在 3.16 上下。在磷酸铁液体培养基中 JL-1 菌株在 36 h 溶磷效果最佳为 16.35 $\mu\text{g/mL}$, pH 值从 0 h 的 7.18 降至 12 h 的 2.53,

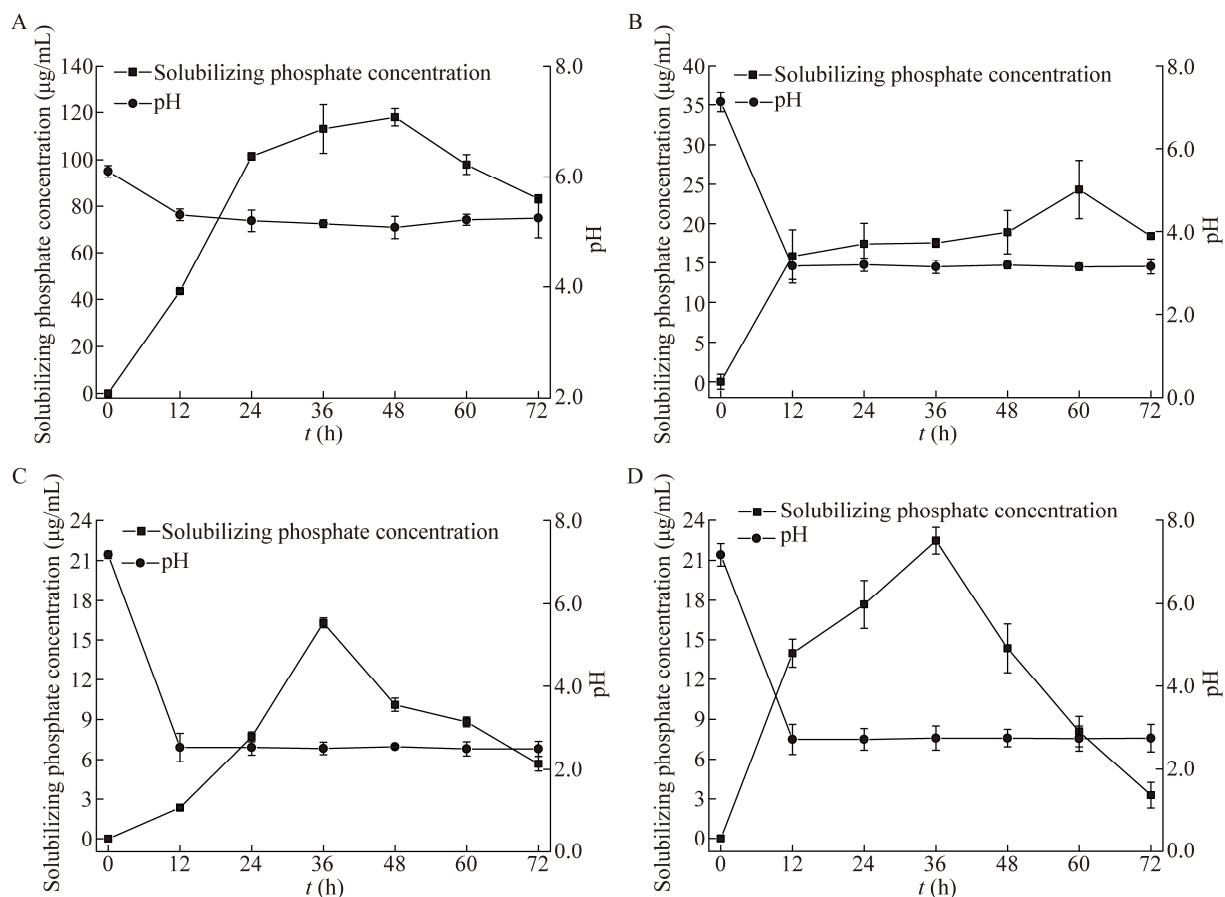


图2 菌株 JL-1 对难溶性磷源的溶解及其发酵体系 pH 的变化

Figure 2 Phosphate solubilizing effects of different insoluble phosphorus sources by strain JL-1 and the pH changes of fermentation broth

注: A: 磷酸三钙解磷动态曲线; B: 过磷酸钙解磷动态曲线; C: 磷酸铁解磷动态曲线; D: 磷酸铝解磷动态曲线。

Note: A: Dynamic phosphorylation curve of tricalcium phosphate; B: Dynamic phosphorylation curve of calcium superphosphate; C: Dynamic phosphorylation curve of iron phosphate; D: Dynamic phosphorylation curve of aluminum phosphate.

后续发酵过程中 pH 变化不明显。在磷酸铝液体培养基中 36 h 达到最佳溶磷量 22.47 $\mu\text{g/mL}$, pH 的变化与在磷酸铁液体培养基中相似。不动杆菌 JL-1 菌株在这 3 种培养基中的溶磷效果十分微弱。通过 pH 值来看, 从 12 h 开始, 除磷酸钙培养基以外的其他 3 种培养基 pH 值太低导致发酵液的环境过酸, 这种环境不适宜不动杆菌 JL-1 菌株的生长以及代谢产生有机酸或酶类。因此可判断出不动杆菌 JL-1 菌株对难溶性磷源的溶磷效果强弱依次为: 磷酸钙>过磷酸钙>磷酸铝>磷酸铁。

2.2 菌体自身对磷的固化作用

菌体在自身繁殖前期需要磷元素, 会固化吸收

培养基中的磷, 因此对同一份发酵液做破碎与不破碎 2 种处理, 使得菌体裂解释放出已固化的磷, 处理前后上清液中的磷含量如图 3 所示, 被菌体固化的磷量如表 1 所示。

由图 3 与表 1 可知, JL-1 菌株在磷酸三钙培养基中发酵 12 h 时, 菌体固化吸收了 586.5 μg 磷量, 培养 24 h 时固化吸收了 1102.5 μg , 36 h 时固化吸收了 771.0 μg , 48 h 后固化吸收的磷量明显降低, 可见 24 h 固化的磷最高。根据不动杆菌 JL-1 菌株在磷酸钙中的生长曲线^[22]可知, 此时间段为菌体生长的对数期, 菌体的生长需要消耗磷, 菌株在进行解磷的同时, 为了满足自身生长的需要固化

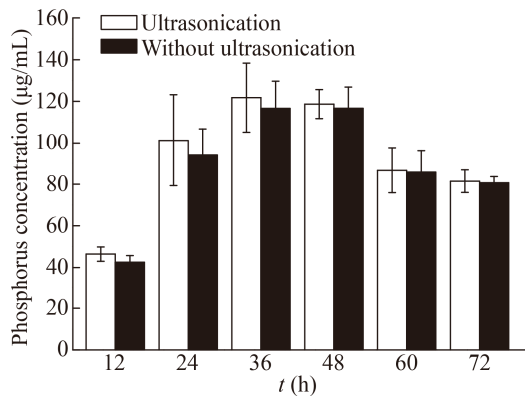


图3 超声前后上清液中磷含量变化

Figure 3 Changes of phosphorus concentration before and after ultrasonication

表1 被固化的磷量

Table 1 The amount of phosphorus absorbed by the strain

Time (h)	Amount of phosphorus absorbed (μg)
12	586.5±3.91c
24	1 102.5±10.10a
36	771.0±5.05b
48	297.0±7.15d
60	127.5±8.66e
72	120.0±9.90e

注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters represented significant difference ($P < 0.05$).

了一部分磷用于自身代谢^[23]，当菌体生长达到平稳期以及衰亡期时，对磷的需求量将会减少，而且在细胞死亡后胞内的磷又可释放到培养液中。

2.3 发酵前后粒径的变化

动态解磷曲线表明不动杆菌 JL-1 菌株具有溶磷效果，为进一步证实菌体对磷酸钙的溶解作用，通过激光粒度仪测量出发酵前后发酵体系粒径大小，如图4所示。

发酵前的体系 $D_{50}=18.07 \mu\text{m}$ (D_{50} 是指累计分布百分数达到50%时对应的粒径值)， $D_{10}=3.439 \mu\text{m}$ ， $D_{90}=42.78 \mu\text{m}$ 。发酵48 h后的发酵液体系 $D_{50}=14.64 \mu\text{m}$ ， $D_{10}=1.260 \mu\text{m}$ ， $D_{90}=37.04 \mu\text{m}$ 。发酵48 h后发酵液中的颗粒粒径分布相较于发酵0 h明显整体变小，且大粒径处的颗粒消失，证明了不动

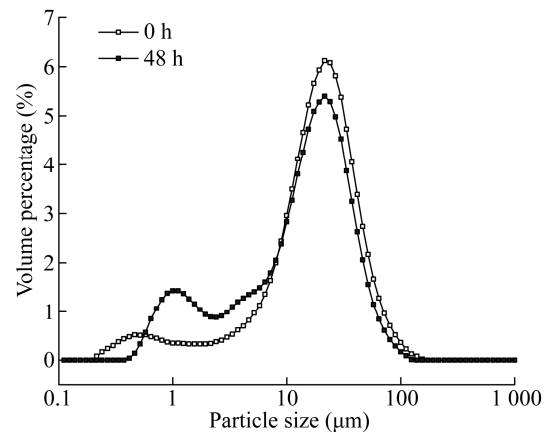


图4 发酵前后粒径的变化

Figure 4 Particle size distribution before and after fermentation

杆菌 JL-1 菌株在溶磷过程中对磷酸钙有侵蚀作用。图4中发酵48 h的曲线前端有一处凸起的曲线，即48 h的发酵液中粒径为1 μm的颗粒分布明显高于0 h的发酵液中，而不动杆菌 JL-1 菌株的菌体直径在1 μm左右，所以此处凸起的曲线是粒度仪检测到的不动杆菌菌体，小粒径处的颗粒分布增加可能是由于出现大量菌体的贡献。

2.4 发酵液中的有机酸种类及其含量测定

前期研究表明，在不动杆菌 JL-1 菌株的解磷过程中起主要作用的是酸解，辅助的是酶解^[22]。酸解是指在微生物代谢过程中分泌各种小分子量有机酸使不溶性磷溶解的过程。为确定酸解在不动杆菌 JL-1 菌株解磷过程中的作用，利用高效液相色谱对不溶性磷酸钙和易溶性磷酸氢二钾培养基中的有机酸种类与含量进行分离和测定，比较结果见表2和表3。

由表2可知，在磷酸钙培养基中共检测到葡萄糖酸、丙酸、丙酮酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸7种有机酸，且随发酵时间的延长其含量有所变化。葡萄糖酸、丙酸、乳酸、乙酸、柠檬酸自开始(0 h)就存在，应该是种子液本身就含有 JL-1 菌株代谢产生的有机酸，接入发酵液后菌体继续进行有机酸代谢，葡萄糖酸、丙酸、乙酸于发酵24 h时浓度达到了最高，分别为0.91、118.11和0.65 mg/mL；

表 2 磷酸钙培养液中有机酸检测结果

Table 2 Organic acids in medium with Ca₃(PO₄)₂

Fermentation time (h)	Gluconic acid (mg/mL)	Propionic acid (mg/mL)	Pyruvic acid (μg/mL)	Lactic acid (mg/mL)	Acetic acid (mg/mL)	Citric acid (mg/mL)	Succinic acid (mg/mL)
0	0.52±0.09bc	56.55±0.84c	—	0.25±0.06c	0.09±0.03d	0.05±0.02c	—
12	0.64±0.09b	42.46±1.09d	—	0.34±0.08c	0.23±0.05bc	0.07±0.02bc	0.02±0.02d
24	0.91±0.07a	118.11±2.00a	—	0.35±0.06c	0.65±0.06a	0.12±0.03bc	0.77±0.08c
36	0.43±0.06d	62.84±2.35b	—	0.31±0.04c	0.17±0.05cd	0.12±0.03b	0.75±0.06c
48	0.57±0.09bc	60.14±1.01b	10.58±0.52b	0.76±0.07b	0.12±0.05d	0.13±0.02b	3.00±0.11b
60	0.60±0.04b	34.97±1.73e	22.84±0.79a	0.80±0.07ab	0.25±0.05bc	0.29±0.06a	4.66±0.36a
72	0.60±0.03b	41.32±1.18d	11.57±0.27b	0.96±0.08a	0.29±0.03b	0.30±0.03a	4.45±0.47a

注：同列数值后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；—：未检测到。

Note: Different lowercase letters after the same column of values represented significant difference ($P<0.05$). —: Not detected.

表 3 磷酸氢二钾培养基中有机酸检测结果

Table 3 Organic acids in medium with K₂HPO₄

Fermentation time (h)	Gluconic acid (mg/mL)	Propionic acid (mg/mL)	Pyruvic acid (μg/mL)	Lactic acid (mg/mL)	Acetic acid (mg/mL)	Citric acid (mg/mL)	Succinic acid (mg/mL)
0	1.53±0.06a	27.61±0.62de	32.92±2.13c	—	—	0.2±0.04	—
12	0.59±0.09c	18.01±0.71f	26.17±0.82d	0.80±0.11b	1.08±0.09b	—	0.28±0.02c
24	0.81±0.15b	42.66±1.09a	46.02±0.88a	0.97±0.12a	1.40±0.07a	—	0.45±0.05a
36	0.72±0.09bc	28.21±0.50d	36.18±0.97b	0.87±0.05ab	1.13±0.09b	—	0.31±0.03bc
48	0.68±0.06bc	33.30±1.74b	38.13±0.88b	0.89±0.11ab	1.21±0.09b	—	0.40±0.03a
60	0.73±0.06bc	31.04±0.69c	32.79±1.15c	0.88±0.04ab	1.19±0.06b	—	0.38±0.06ab
72	0.84±0.05b	26.00±1.08e	44.14±0.98a	0.96±0.03ab	1.22±0.06b	—	0.45±0.04a

注：同列数值后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；—：未检测到。

Note: Different lowercase letters after the same column of values represented significant difference ($P<0.05$). —: Not detected.

在测定的 7 种有机酸中，丙酸在发酵液中的浓度是最高的，可见其在不动杆菌 JL-1 菌株酸解磷酸钙的过程中起到了主要作用，对应于 24 h 丙酸含量最高，发酵体系的 pH 值也在此时达到最低值，而乳酸、柠檬酸的含量于 72 h 达到最大值，分别为 0.96、0.30 mg/mL；丙酮酸和琥珀酸并不是发酵初始就存在，而是随着发酵过程逐渐产生，并于发酵 60 h 时达到其最大值 22.84 μg/mL 和 4.66 mg/mL。在整个溶磷过程中，48 h 时的溶磷量最高，而有机酸浓度最高的时间点与此时间不一致，如浓度最大的丙酸其浓度于 24 h 即达到最大值，而后浓度有所下降，有些有机酸如琥珀酸于 60 h 时才达到最大值，这说明伴随着发酵进程，溶磷量的增加是一个累积过程，是多种有机酸综合作用的效果，不同的有机酸

在菌体内的代谢途径存在差异，可在发酵的不同时间为酸解磷做出贡献，最终使得溶磷量增加。

在磷酸氢二钾培养基中，随着发酵的进行主要检测到 6 种有机酸，柠檬酸只在发酵 0 h 时存在。葡萄糖酸的浓度在 0 h 最高，稍后有所降低；丙酸、丙酮酸、乳酸、乙酸及琥珀酸的浓度均于 24 h 时达到了最大值，分别为 42.66 mg/mL、46.02 μg/mL、0.97 mg/mL、1.40 mg/mL、0.45 mg/mL；磷酸氢二钾为可溶性磷源，当存在磷饥饿胁迫时不动杆菌 JL-1 菌株溶磷效果会更强，所以面对可溶性磷源时，不动杆菌 JL-1 菌株代谢分泌出大量有机酸的能力有所减弱，体现在某些有机酸的浓度有所下降，如丙酸的最高浓度较难溶性磷源大幅下降，且发酵后期有机酸的种类有所减少。

2.5 酸性磷酸酶活性与碱性磷酸酶活性的测定

不动杆菌 JL-1 菌株在磷酸钙培养基与磷酸氢二钾培养基中产生酸性磷酸酶与碱性磷酸酶的结果比较见图 5 和图 6。

在 0–24 h 磷酸钙培养基中的酸性磷酸酶活性低于磷酸氢二钾培养基中的酸性磷酸酶活性,但从 24 h 后磷酸钙培养基中的酸性磷酸酶活性持续升高,直到 60 h 达到峰值为 22 901.32 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,而磷酸氢二钾培养基中的酸性磷酸酶活性呈曲折型前进,在 36 h 达到了最高值 9 547.22 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,可见,不动杆菌 JL-1 菌株在磷酸钙培养基中比在磷酸氢二钾培养基中能分泌更多的酸性磷酸酶。碱

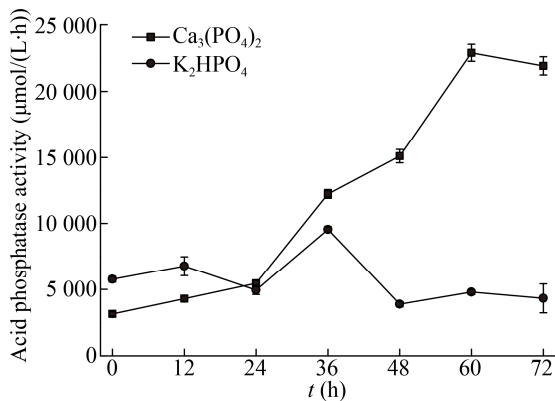


图 5 不同培养基中的酸性磷酸酶活性的变化
Figure 5 Changes of acid phosphatase activity in medium with different phosphorus sources

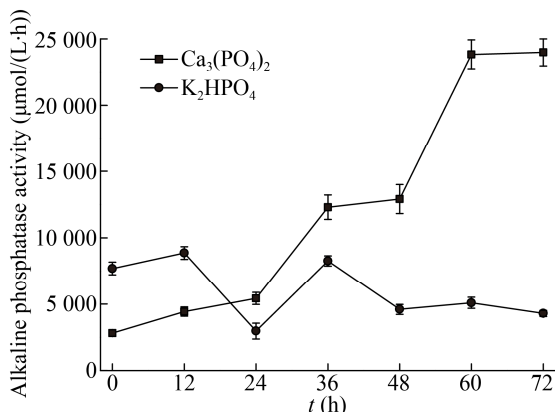


图 6 不同培养基中的碱性磷酸酶活性的变化
Figure 6 Changes of alkaline phosphatase activity in medium with different phosphorus sources

性磷酸酶的变化趋势与酸性磷酸酶基本一致,自 24 h 后一直是磷酸钙培养基中的碱性磷酸酶酶活较高,最高达 23 826.02 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,与酸性磷酸酶最高活性相差甚小。总体而言,不溶性磷酸钙造成的贫磷条件对酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的分泌有一定的诱导作用,而高浓度的磷素水平则会抑制部分酶活。

3 讨论

土壤中含有多种存在形式的难溶性磷酸盐,占土壤磷酸盐总量的 95%–99%^[23],施肥可以一定程度缓解植物磷素供应的问题,但肥料中水溶性磷能被土壤矿物固定,此外还可以与土壤中金属离子如钙、铁、镁等结合成难溶性磷酸盐^[24],因此需要解磷微生物将以上难溶性磷释放出来。伊望等^[25]研究产气杆菌 PSB28 对磷酸钙、过磷酸钙、磷酸铝、磷酸铁的溶解能力时发现,菌株对不同难溶性磷源的溶解能力有巨大差异,溶解性最好的是磷酸钙,其次是过磷酸钙,再次是磷酸铝、磷酸铁,这与本研究中不动杆菌 JL-1 菌株对于几种不溶性磷源的溶解效果是一致的。观察 pH 值的变化可见,从 12 h 开始除磷酸钙培养基以外的其他 3 种培养基 pH 值太低而导致发酵液的环境过酸,这种环境不适宜不动杆菌 JL-1 菌株的生长以及代谢产生有机酸或酶类。因此,在实际利用时可以结合其他解磷菌完成对除磷酸钙以外其他形式难溶性磷酸盐中磷元素的释放。

微生物可以吸收利用土壤中的有效磷,将其转变为体内的有机磷化合物,再经体内酶解释放出磷酸,一部分被微生物同化,一部分再被土壤胶体吸附固定。本研究在发酵培养中也发现了类似的现象,经超声波破碎后发酵上清中的可溶性磷含量有升高的现象,这部分磷即来自于菌体在溶磷过程中固化吸收的部分,随着发酵时间的延长,固化的磷量减少。这可能是由于发酵液中基质被消耗,不能很好地满足微生物的生长,部分菌体发生了死亡现象^[26],死亡的细胞又释放部分固定的磷素,形成一个动态平衡。

由于解磷微生物能溶解释放土壤含磷物质中的磷,从而有可能导致了土壤矿物结构发生转化。对于含有磷酸钙不溶性颗粒的发酵体系,通过激光粒度仪测定其发酵前后颗粒分布的变化,直观地分析微生物对难溶性磷源的作用效果,进一步证明 JL-1 菌株的溶磷能力。JL-1 菌株发酵后,发酵体系的大粒径处的颗粒消失,很好地证明了 JL-1 菌株对大颗粒磷酸钙颗粒的溶解作用。

有机酸在解磷微生物解磷过程中发挥着重要的作用,一种猜测是由于在微生物代谢过程中分泌各种小分子量有机酸,如柠檬酸、草酸、乙酸等,使培养基质的酸度升高,同时有机酸阴离子能螯合钙、镁、铝、铁等金属阳离子,从而将难溶性磷酸盐中的磷转化成可溶形态^[25]。本研究测定表明不动杆菌 JL-1 菌株在解磷过程中主要分泌 7 种有机酸:葡萄糖酸、丙酸、丙酮酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸,这些有机酸的种类在不同发酵时间存在差异,如丙酮酸在 36 h 后才检测到;而且产生的有机酸的含量存在很大的差异,如 24 h 的丙酸含量为 118.11 mg/mL,柠檬酸的含量只有 0.12 mg/mL。研究表明,不同的微生物在溶解不溶性磷酸盐时,产生的有机酸种类和数量都有很大的不同,特定的解磷菌在解磷过程中分泌的有机酸种类和数量也在变化^[27],这与本研究结果一致。Kerkut^[28]认为葡萄糖酸是一些革兰氏阴性解磷细菌产酸解磷的主要机制。然而不动杆菌 JL-1 菌株呈革兰氏阴性^[22],发酵过程中也检测到葡萄糖酸的存在,但丙酸的含量更高,说明丙酸在不动杆菌 JL-1 菌株解磷的过程中起到了主要作用,这可能是不同菌株的代谢特点所致。

微生物在生长繁殖时能利用其自身矿化或溶解的部分磷组建其细胞组分,磷酸酶所起的作用是将死亡微生物菌体中的有机磷转化为无机磷,这部分无机磷被微生物吸收后又可以参与微生物的新陈代谢过程^[29]。本实验以可溶性磷源为对照,测定了酸性磷酸酶和碱性磷酸酶在不动杆

菌 JL-1 菌株解磷过程中的作用,结果显示在贫磷条件下两种酶的酶活都较高且显著高于对照,这可能是菌株处于贫磷环境时激活了代谢过程中酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的合成途径。因此,在不动杆菌 JL-1 菌株解磷过程中测定到的可溶性磷含量,是有机酸溶解的难溶性磷和由磷酸酶催化后由菌体内的有机磷转化的可溶性磷含量之和,即不动杆菌 JL-1 菌株所活化的磷应包括其自身利用的那部分磷^[3]。

4 结论

不动杆菌 JL-1 菌株对难溶性磷源的溶解效果具有一定的差异,对磷酸钙有最好的溶解作用,粒度测定显示菌株对磷酸钙颗粒有一定的侵蚀作用,菌株在解磷过程中通过分泌有机酸和酸性、碱性磷酸酶,使不溶性磷释放。本研究对将不动杆菌运用到实际生活中研发出可利用的微生物磷肥、解决目前的土壤磷素难利用这一问题提供了有价值的菌株资源与技术参考。

REFERENCES

- [1] Lin Y, Si CC, Han WH, et al. Research progress in phosphate-solubilizing microorganisms[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2017, 29(2): 99-103 (in Chinese)
林英, 司春灿, 韩文华, 等. 解磷微生物研究进展[J]. 江西农业学报, 2017, 29(2): 99-103
- [2] Elser JJ. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity?[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(6): 833-838
- [3] Wu F, Li JR, Chen YL, et al. Effects of phosphate solubilizing bacteria on the growth, photosynthesis, and nutrient uptake of *Camellia oleifera* Abel[J]. Forests, 2019, 10(4): 348
- [4] Yi J. Screening of phosphorus-solubilizing strain and its phosphate dissolving mechanism[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2011 (in Chinese)
伊昱. 高效解磷细菌的筛选及解磷机理的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2011
- [5] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. Biotechnology Advances, 1999, 17(4/5): 319-339
- [6] Wang YT, Chen L, Wang T, et al. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria from *Arctium lappa* rhizosphere soil and its growth

- characteristics[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2018, 47(10): 57-63 (in Chinese)
- 王样庭, 陈玲, 王陶, 等. 牛蒡根际土壤解磷菌的筛选、鉴定及生长特性[J]. 河南农业科学, 2018, 47(10): 57-63
- [7] Lin QM, Zhao HY, Zhao XR. The characteristics of solubilizing rock phosphate by four isolates of bacteria and fungi[J]. Microbiology China, 2002, 29(6): 24-28 (in Chinese)
- 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 24-28
- [8] Jiang LH, Liu ZH, Shi J, et al. Solubilization capacity of insoluble phosphates and it's growth of biomass by the phosphate Fungi (F2)[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(1): 42-46 (in Chinese)
- 江丽华, 刘兆辉, 石璟, 等. 真菌F2的解磷能力及其生长动态研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 42-46
- [9] Chung H, Park M, Madhaiyan M, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10): 1970-1974
- [10] Cunningham JE, Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(5): 1451-1458
- [11] Kim KY, Jordan D, McDonald GA, et al. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 26(2): 79-87
- [12] Vazquez P, Holguin G, Puente ME. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon[J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 30(5/6): 460-468
- [13] Feng K, Lu HM, Sheng HJ, et al. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils[J]. Pedosphere, 2004, 14(1): 85-92
- [14] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27(3): 257-263
- [15] Song YC, Li XL, Feng G. Effect of phosphatase activity on soil organic phosphorus loss in the environment of clover growth[J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(7): 1130-1135 (in Chinese)
- 宋勇春, 李晓林, 冯固. 菌根真菌磷酸酶活性对红三叶草生境中土壤有机磷亏缺的影响[J]. 生态学报, 2001, 21(7): 1130-1135
- [16] Wang H. Effects of phosphate solubilizing bacteria on soil microorganisms and their temporal and spatial distribution characteristics[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2017 (in Chinese)
- 王欢. 高效解磷菌对土壤微生物的影响及时空分布特性[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017
- [17] Zhu PM, Yang XM, Xu YC, et al. High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(1): 107-112 (in Chinese)
- 朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112
- [18] Pan P, Kang QR, Li X. Determination of total phosphorus in soil by ammonium molybdate spectrophotometry[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2003, 20(5): 697-699 (in Chinese)
- 潘平, 康清蓉, 李晓. 分光光度法测定土壤中总磷[J]. 光谱实验室, 2003, 20(5): 697-699
- [19] Zhang YL, Yang H, Zhou WQ, et al. The study of yoghurt quality based on granularity analysis[J]. The Food Industry, 2011, 32(11): 60-62 (in Chinese)
- 章银良, 杨慧, 周文权, 等. 基于粒度分析的酸奶品质研究[J]. 食品工业, 2011, 32(11): 60-62
- [20] Sui XW, Li Y, Hu XB, et al. Development progress and key technologies of laser particle size analyzer[J]. Journal of Electronic Measurement and Instrumentation, 2016, 30(10): 1449-1459 (in Chinese)
- 隋修武, 李瑶, 胡秀兵, 等. 激光粒度分析仪的关键技术及研究进展[J]. 电子测量与仪器学报, 2016, 30(10): 1449-1459
- [21] Liu SL, Zhu SL, Qi XH, et al. Study on organic acid secreted from 4 strains phosphorus-solubilizing bacteria and calcium phosphate dissolving ability[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2017, 54(6): 1114-1121 (in Chinese)
- 刘胜亮, 朱舒亮, 祁先慧, 等. 四株解磷菌分泌有机酸与溶解磷酸三钙能力的研究[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(6): 1114-1121
- [22] Li W, Mo GA, Sun X, et al. Study on characteristics of phosphate solubilization by *Acinetobacter indicus* JL-1[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 311-315 (in Chinese)
- 李文, 莫港澳, 孙欣, 等. 不动杆菌 JL-1 降解磷的性能研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 311-315
- [23] Ding HX, Yu WT. Review on soil inorganic-P fractionation and the influential factors on P bio-availability[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(3): 681-686 (in Chinese)
- 丁怀香, 宇万太. 土壤无机磷分级及生物有效性研究进展[J]. 土壤通报, 2008, 39(3): 681-686
- [24] Wang H. Summer maize response to fertilizer sources and their application methods in the sandy soils of North China

- plain[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese)
- 王贺. 华北平原砂质土壤夏玉米对肥料类型及施肥方法的响应研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2012
- [25] Yi J, Gao XR, An LJ. The study of phosphate solubilization mechanism of *Enterobacter aerogenes* PSB28[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(27): 245-249 (in Chinese)
- 伊鋈, 高晓蓉, 安利佳. 产气肠杆菌 PSB28 的解磷机理研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(27): 245-249
- [26] Wu HY, Jin RD, Fan ZW, et al. Mechanism of solubilizing phosphate by *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36(2): 171-175 (in Chinese)
- 吴海燕, 金荣德, 范作伟, 等. 解磷巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的溶磷机理探讨[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(2): 171-175
- [27] Deubel A, Gransee A, Merbach W. Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2000, 163(4): 387-392
- [28] Kerkut GA. Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms: edited by A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright and E. Yagil, 316 pp. 1987. American society for microbiology, \$49[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1988, 91(2): 403
- [29] Zhong CQ, Huang WY. Comparison in P-solubilizing effects between different P-solubilizing microbes and variation of activities of their phosphatases[J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(2): 286-294 (in Chinese)
- 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 286-294

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2020 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413